

Eine radioaktive Methode
zur Bestimmung der Aktivität
der UDP-Galaktose-4-Epimerase

Christian Eign



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554827_0116

Aus der Kinderklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital der
Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. H.-B. Hadorn

Eine radioaktive Methode zur Bestimmung der
Aktivität der UDP-Galaktose-4-Epimerase.

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christian Eign
aus
Straubing
Jahr
1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Endres

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. H.-B. Hadorn

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Y. S. Shin

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 12.02.1987

In Dankbarkeit
meinen lieben Eltern
gewidmet

Für die freundliche Überlassung
des Themas und für die hervorragende
Unterstützung bei der Durchführung
der Arbeit möchte ich

Herrn Prof. Dr. med. W. Endres und
Frau Dr. Y. S. Shin

recht herzlich danken.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Der Galaktosemetabolismus	1
1.2 Bedeutung der UDP-Galaktose-4-Epimerase im Stoffwechsel	3
1.3 Störungen der UDP-Galaktose-4-Epimerase	4
1.4 Zielsetzung der Arbeit	6
2. Material	7
2.1 Gewebe- und Blutproben	7
2.2 Geräte	7
2.3 Chemikalien	8
3. Methodik	9
3.1 Methode der Bestimmung der Epimeraseaktivität	9
3.1.1 Spektrophotometrische Methode	9
3.1.2 Isotopenmethode	10
3.2 Hämoglobinbestimmung nach der Hämoglobin- cyanidmethode	13
3.3 Proteinbestimmung nach Lowry, modifiziert als Mikromethode	14
4. Ergebnisse	15
4.1 Messung der Epimeraseaktivität in Erythrozyten durch den spektrophotometrischen Test	15
4.2 Messung der Epimeraseaktivität in Erythrozyten nach der Isotopenmethode	23
4.3 Kinetikbestimmung der Epimerase in Erythro- zyten nach der Isotopenmethode	26

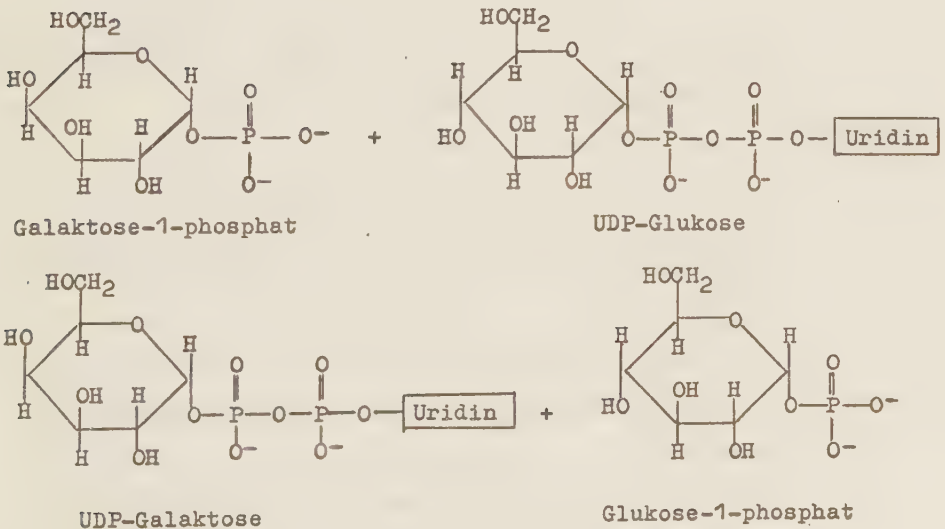
4.4	Enzymaktivität in den Erythrozyten eines Patienten	29
4.5	Die Epimerase in Leber- und Nierengewebe	31
5.	Diskussion	33
5.1	Zur Methodik	33
5.2	Die Aktivität der Epimerase in Erythrozyten	34
5.3	Die Aktivität der Epimerase in Leber und Niere	36
6.	Zusammenfassung	38
	Literaturverzeichnis	39
	Lebenslauf	42

1. EINLEITUNG

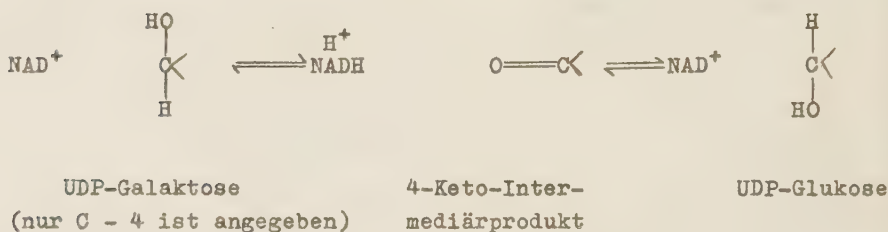
1.1 Der Galaktosemetabolismus

Die Galaktose entsteht durch Hydrolyse der Laktose, des Hauptkohlenhydrates der Milch (1). Sie wird dann in vier Schritten zu Glukose-1-phosphat umgewandelt. Der erste Schritt dieses Stoffwechsels der Galaktose-Glukose-Umwandlung besteht in einer Phosphorylierung von Galaktose zu Galaktose-1-phosphat durch die Galaktokinase. $\text{Galaktose} + \text{ATP} \rightarrow \text{Galaktose-1-phosphat} + \text{ADP} + \text{H}^+$

In einer Austauschreaktion, die von der Galaktose-1-phosphat-Uridyltransferase katalysiert wird, entsteht dann UDP-Galaktose.



Weiterhin gebunden an UDP entsteht durch Epimerisierung Galaktose aus Glukose. Die Konfiguration der Hydroxylgruppe am C - 4 wird dabei durch die UDP-Galaktose-4-Epimerase umgedreht, die als fest gebundenen Bestandteil NAD^+ enthält. Fluoreszenzuntersuchungen haben gezeigt, daß dieses NAD^+ während der Katalyse vorübergehend zu NADH reduziert wird. Das NAD^+ übernimmt wahrscheinlich das Wasserstoffatom, das an das C - 4 des Zuckers gebunden ist; dabei entsteht ein 4-Ketozucker als Intermediärprodukt. NADH überträgt dann seinen Wasserstoff auf die andere Seite des C - 4 unter Bildung des anderen Epimeren.

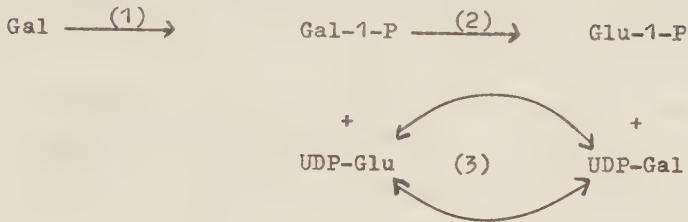


Die Summe der Reaktionen, die von der Galaktokinase, der Transferase und der Epimerase katalysiert werden, lautet:
 Galaktose + ATP $\longrightarrow$ Glukose-1-phosphat + ADP + H^+

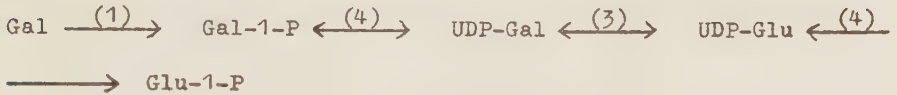
Die Epimerasereaktion ist reversibel; das Gleichgewicht liegt beim Verhältnis 3 : 1 zugunsten des Galaktoderivats (2).

Ein Alternativweg des Galaktosestoffwechsels wurde beschrieben, um zu erklären, wie bei älteren Patienten mit klassischer Galaktosämie, bei denen der Hauptweg wegen des Transferasemangels blockiert ist, eine geringe Menge Galaktose umgewandelt werden kann (3):

Hauptweg des Galaktosestoffwechsels:



Alternativweg des Galaktosestoffwechsels:



(1) Galaktokinase

(2) Galaktose-1-phosphat-Uridyltransferase

(3) Uridindiphosphat-Galaktose-4-Epimerase

(4) Pyrophosphorylase

1.2 Bedeutung der UDP-Galaktose-4-Epimerase im Stoffwechsel

Die von der Epimerase katalysierte Reaktion besitzt nicht nur Bedeutung für die Verwertung der Galaktose als Brennstoff (1). Die Umwandlung von UDP-Glukose in UDP-Galaktose ist zur Synthese der Galaktose-Einheiten in den komplexen Polysacchariden und Glykoproteinen notwendig, wenn der Anteil der Galaktose in der Nahrung zu gering ist.

Zur Bildung des Milchzuckers (Laktose) in der Brustdrüse wird nicht die Galaktose der Nahrung verwendet (2). Es ist vielmehr zunächst die Umwandlung eines Moleküls Glukose in Galaktose erforderlich, die auf der Stufe des UDP-Derivats durch die Epimerase erfolgt.

Die oben beschriebene Epimerisierung der UDP-Glukose zur UDP-Galaktose dient umgekehrt auch zur Einschleusung von Galaktose in den Glukosestoffwechsel.

Der Hauptweg des Galaktosestoffwechsels (s.o.) enthält die direkte Umwandlung von Gal-1-P in Glu-1-P durch die Transferase (3). Das erfordert UDP-Glu als Kofaktor, der während des Reaktionsablaufes in UDP-Gal umgewandelt wird. Die Epimerase ist notwendig, um UDP-Glu aus UDP-Gal wiederherzustellen, um so die fortdauernde Aktivität der Transferase zu ermöglichen.

1.3 Störungen der UDP-Galaktose-4-Epimerase

Gitzelmann (4) berichtete 1972 von einem Neugeborenen mit normalen Transferase- und Galaktokinaseaktivitäten, während die Epimeraseaktivität in den Erythrozyten und Leukozyten nicht nachweisbar war. Dagegen zeigte eine Leberbiopsieprobe des Patienten normale Aktivität. Wie eine zwei Jahre dauernde Beobachtung (5) des Patienten ergab, verliefen Wachstum und Entwicklung störungsfrei. Beide Eltern hatten eine verminderte Epimeraseaktivität; die Stammbaumanalyse war mit einem rezessiven Vererbungsmodus zu vereinbaren. Vier Jahre später berichteten Gitzelmann et al. (6) über acht Fälle eines Epimerasedefektes in drei Familien. Alle Personen waren gesund und hatten eine normale Galaktosetoleranz, pathologisch war ein erhöhtes Galaktose-1-phosphat in den Erythrozyten, auf die sich der Defekt beschränkte. Holton (3) diagnostizierte bei einem Säugling, der am 5. Lebenstag die schweren klinischen Symptome der klassischen Galaktosämie zeigte, einen Defekt der Epimerase.

Das Krankheitsbild war geprägt durch Ikterus, Gewichtsverlust, Erbrechen, Hepatomegalie und Hyperaminoazidurie. Erniedrigte Epimeraseaktivitäten wurden in den Erythrozyten und Fibroblasten gefunden.

Eine Studie von Oyanagi et al. (7) befaßt sich mit dem klinischen und biochemischen Befund eines partiellen Epimerasedefektes bei einem Säugling. Die Enzymaktivität in den Erythrozyten betrug 7,5 % des Normalwertes, die Aktivität in der Leber war nicht erniedrigt. Die Epimeraseaktivität der Eltern lag zwischen den Kontrollwerten und den Werten ihres Kindes, so daß eine Heterozygotie anzunehmen ist.

Gitzelmann et al. (6) diskutierten eine mögliche Beziehung zwischen dem Enzymdefekt und der Rhesusblutgruppe, da ihre Fälle alle Rhesus ccdee waren, womit sie eine Genverbindung zwischen der Epimerase und den Rhesusorten postulierten.

1979 beschrieben Benn et al., daß das Gen für die Epimerase der pter → p21- Region des Chromosoms 1 zugeteilt werden könnte (8).

Garibaldi et al. berichteten von einem generalisierten Epimerasedefekt, wobei das betroffene Kind die Symptome der klassischen Galaktosämie zeigte (9).

Untersuchungen an Erythrozyten, Lymphozyten und Fibroblasten bestätigten einen schweren Mangel der Epimeraseaktivität. Auch hier war Heterozygotie bei den Eltern nachzuweisen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung einer radioaktiven Methode zur Messung der Aktivität der UDP-Galaktose-4-Epimerase. Mit dieser Methode soll die Epimerase-Aktivität in normalen menschlichen Erythrozyten und Organgeweben ermittelt und derjenigen eines Patienten mit Epimerasemangel gegenübergestellt werden. Zur Charakterisierung der Kinetik des Enzyms in verschiedenen Geweben werden Lineweaver-Burk-Diagramme erstellt. In den Versuchen soll sich die Vorteilhaftigkeit der Isotopenmethode gegenüber der photometrischen Methode erweisen.

2. MATERIAL

2.1 Gewebe- und Blutproben

Die größtenteils von anderen Kliniken zugesandten Blutproben stammten von Patienten, die auf verschiedene Stoffwechselkrankheiten untersucht wurden. Bei dem Patienten handelt es sich um einen neun Monate alten Jungen mit Verdacht auf Epimerasedefekt. Als Kontrollproben dienten o.g. Blutproben sowie solche freiwilliger Blutspenden des Personals der von Haunerschen Kinderklinik der Universität München.

Autopsiepräparate normaler menschlicher Organe erwachsener Individuen waren vom Institut für Rechtsmedizin der Universität München erhältlich. Die Zeit zwischen dem Todes-eintritt und der Probeentnahme betrug 8 - 12 Stunden.

2.2 Geräte

Eppendorf-Photometer M 167 671

große Ultrazentrifuge der Firma Hettich

kleine Ultrazentrifuge der Firma Hettich

Heizblock der Firma Liebisch 32°C und 95°C

Gefrierschrank der Firma Bosch, Temperatur -20°C

Säulenständer der Firma Bio-Rad. Laboratories

Einmalküvetten, Einmalreagenzgläser

Eismaschine

Counter zum Messen der Betastrahlung von ^{14}C

Zählgefäße

Eppendorfhütchen, Pipetten

pH-Meter

Bechergläser

2.3 Chemikalien

Sigma Chemie, München, lieferte folgende Substrate bzw.

Enzyme:

UDP-Galaktose, NAD (Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid),
UDP-Glukose-Dehydrogenase, UDP-Glukose-Pyrophosphorylase,
Glukose-1-phosphat, DEAE-Cellulose (Anionenaustauscher)

^{14}C - UDP-Glukose erhielten wir von Amersham Buchler,
Braunschweig.

Von Merck, Darmstadt kamen Pyrophosphat, MgCl_2 , Tris-Cl,
Transformationslösung.

Die Szintillationsflüssigkeit wurde von Zinsser Analytic,
München bezogen.

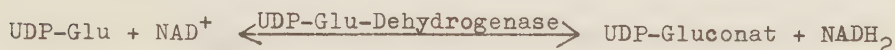
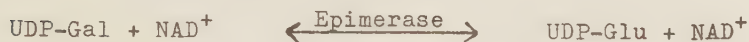
Andere Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt verwendet.

3. METHODIK

3.1 Methode der Bestimmung der Epimeraseaktivität

3.1.1 Spektrophotometrische Methode

Der spektrophotometrische Epimerasetest von Gitzelmann und Steinmann (5), der früher angewandt wurde, besteht aus folgenden zwei Schritten:



Zu 10 μl des 1 : 3 verdünnten Hämolyсата werden 90 μl Reaktionsgemisch (RG_1) gegeben.

RG_1 setzt sich zusammen aus:

20 μl UDP-Gal 5 mM

50 μl NAD 10 mM

20 μl Glycylglyzin NaOH-Puffer (1M, pH 9,0)

Nach Zugabe des RGes werden die Eppendorfgefäße sofort in den Inkubator bei 32°C gestellt, wo unter Zeitkontrolle die 1. Enzymreaktion abläuft, die mittels Heizblock bei 95°C abgebrochen wird.

Das 2. Reaktionsgemisch besteht aus:

50 μl Überstand der 1. Reaktion bzw. Standard

200 μl Glycin-NaOH-Puffer 1M, pH 8,7

20 μl NAD 10 mM

Die 2. Reaktion wird mit 20 μl UDP-Glu-Dehydrogenase mit einer Aktivität von 0,15 U/ml katalysiert unter Inkubation bei 32°C.

Nach Abstoppen der Enzymreaktion bei 95°C mißt man am Photometer bei 334 nm die Extinktion von NADH₂.

Die Aktivität der Epimerase wird sodann nach folgender Formel berechnet:

$$A = \frac{C \times E_{\text{probe}} \times F}{E_{\text{st}} \times T} \left[\frac{\mu\text{mol}}{h \times g \text{ Hb}} \right]$$

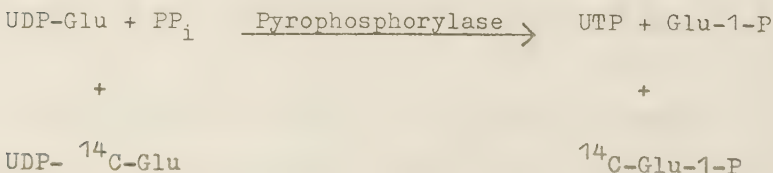
- C = Konzentration der Standardlösung
 E_{probe} = Extinktionsdifferenz der Probe
 E_{st} = Extinktionsdifferenz des Standards
 F = Verdünnungsfaktor
 T = Inkubationszeit

3.1.2 Isotopenmethode

Da die spektrophotometrische Bestimmung der UDP-Glukose oft nicht empfindlich genug erschien, wurde eine neue Methode unter Verwendung eines radioaktiven Isotops entwickelt, die genauer ist und die Messung zahlreicher Proben in einem Ansatz erlaubt.

Der erste Schritt dieser radiometrischen Methode entspricht genau dem des spektrophotometrischen Tests.

Die zweite Reaktion lautet:



Das radioaktive Reaktionsgemisch setzt sich folgendermaßen zusammen:

1 Teil Pyrophosphat 0,5 mM
1 Teil MgCl_2 100 mM
1 Teil Tris-Cl 1 M pH 8,0
1 Teil ^{14}C -UDP-Glukose 2,5 $\mu\text{Ci/ml}$

Der Reaktionsansatz wird gebildet aus 20 μl Überstand der 1. Reaktion bzw. Standardlösung mit den Konzentrationen 0 / 0.025 / 0.05 / 0.1 mM und 80 μl Reaktionsgemisch + 2 μl UDP-Glukose-Pyrophosphorylase ca. 40 U/ml.

Nach der Enzymzugabe wird das Reaktionsgemisch in den Eppendorfgeläßen 15 min bei 32°C inkubiert. Das Abstoppen der Enzymreaktion im Heizblock bei 95°C dauert ca. 3 min.

In jedes EppendorfgeläÙ werden nach dem Abkühlen im Eisbehälter 20 μl Glukose-1-phosphat 50 mM zum Schutz der Säule gegeben. Alle EppendorfgeläÙe werden 2 min zentrifugiert. Die an ihrem unteren Ende mit Glaswolle versehenen und mit destilliertem Wasser gespülten Säulen werden auf 1 ml mit DEAE-Cellulose in der Cl - Form aufgefüllt. Nach Äquilibration mit 2,5 ml 20 mM HCl pipettiert man 100 μl des Überstandes in den EppendorfgeläÙen auf die Säule.

Daraufhin eluiert man 3 x hintereinander die Säulen mit 2,3 ml 20 mM HCl, wobei die Eluate in den unter den Säulen stehenden Plastikvials gesammelt und in einen für den Zweck bestimmten Plastikkanister verworfen werden. Die nächste Fraktion, die aus der Eluation mit 1 ml 20 mM HCl in neue Vials entsteht, wird zur Messung der Radioaktivität des ^{14}C -Glu-1-P verwandt.

Die Hauptfraktion, die aus der Eluation mit 2,5 ml 150 mM HCl hervorgeht, wird wieder in neuen Vials gesammelt und dient zur Messung der UDP- ^{14}C -Glu. In die Vials, die ^{14}C -Glu-1-P enthalten, fügt man 10 ml Szintillationslösung hinzu, und mißt für 0,5 min die Radioaktivität im Szintillationszählapparat. Zur Messung der UDP- ^{14}C -Glu verfährt man ähnlich, indem 17,5 ml Szintillationslösung hinzugegeben werden und 2 min lang gemessen wird.

Der Szintillationszähler quantifiziert die Radioaktivität als "counts per minute" (cpm), womit durch folgende Formel sich die Enzymaktivität errechnet:

$$A = \frac{(\text{cpm}_{\text{Probe}} - \text{cpm}_{\text{Leerwert}}) \times C_{\text{Standard}} \times F}{\text{cpm}_{\text{Standard}}} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{h} \times \text{g Hb}} \right]$$

Der 100 % Wert ergibt sich aus den in ein Eppendorfgesäß gesammelten und zentrifugierten Überstandsresten, wovon 100 μl in 1 Vial pipettiert und mit 3,5 ml 150 mM HCl und 17,5 ml Szintillationslösung versetzt werden.

Die hier beschriebene Methode zur Messung der Epimeraseaktivität in Erythrozyten gilt ebenso für andere Gewebe wie Leber und Niere, mit dem Unterschied, daß diese Gewebe zuvor homogenisiert werden und die Aktivität auf die Proteinkonzentration bezogen wird.

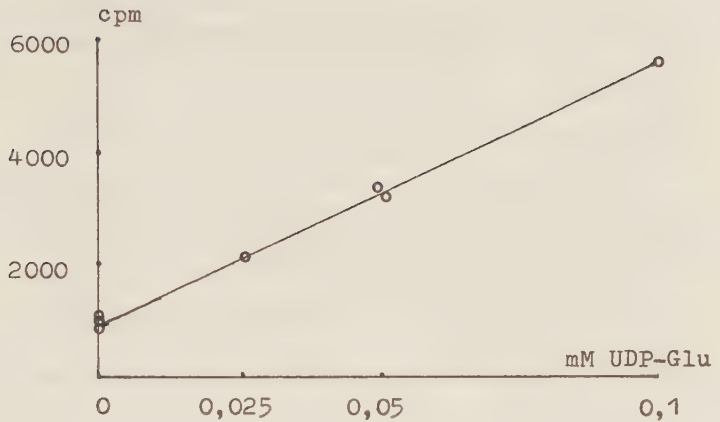


Abb. 1: Eichgerade des UDP-Glu-Standards

Wie in Abb. 1 gezeigt, steigt die Radioaktivität in den 150 mM HCl - Fraktionen linear mit den UDP-Glu-Konzentrationen bis 0,1 mM an.

3.2 Hämoglobinbestimmung nach der Hämoglobincyanidmethode

Reagenzien: Transformationslösung Kal. cyanat 0,05
Kal. ferricyan. 0,20
Natriumbicarbonat 1,00
Aqua dest. ad 1000 ml

Durchführung: 0,02 ml der Probe werden mit 2,5 ml Transformationslösung versetzt, nach 15 min wird die Extinktion bei 546 nm gegen die Transformationslösung gemessen. Der Hb-Wert in g% ergibt sich aus der Formel:

$$E_{546 \text{ nm}} \times 36,8 = \text{g\% Hb}$$

3.3 Proteinbestimmung nach Lowry, modifiziert als Mikromethode

Folgende Reagenzien werden verwendet:

Lösung A = 2 % $\text{Na}_2 \text{CO}_3$ (wasserfrei) in 0,1 N NaOH

Lösung B_a = 5,5 % CuSO_4

Lösung B_b = 1,35% Seignettesalz (Na-K-Tartrat)

Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz

2 % $\text{Na}_2 \text{CO}_3$ (für 1 : 1 Verdünnung Folin)

Mischungen I und II werden immer frisch angesetzt:

I : 0,2 ml B_b + 0,02 ml B_a $\longrightarrow$ 0,22 ml B

II : 5,0 ml A + 0,10 ml B $\longrightarrow$ 5,10 ml C

Standards: 5 mg/ml Rinderserumalbumin werden auf 0,025, 0,05 0,10 0,25 0,50 1.00 mg/ml verdünnt.

Als Leerwert wird Wasser verwendet.

Arbeitsgang: Zu 0,02 ml Probe werden 0,20 ml frisches Kupferreagenz C gegeben und 10 min stehen gelassen. Nach Zugabe von 0,02 Folin Ciocalteus Phenolreagenz wird die Probe gut gemischt, 30 min in Dunkelheit stehen gelassen und anschließend bei 772 nm am Photometer in Mikroküvetten die Extinktion gegen Wasser abgelesen.

4. ERGEBNISSE

4.1 Messung der Epimeraseaktivität in Erythrozyten durch den spektrophotometrischen Test

Bei den 11 Kontrollpersonen im Alter von 2 1/2 Monaten bis 33 Jahren wurde die Aktivität der Epimerase in Erythrozyten bestimmt. Die Werte wurden aus den Extinktionen, die nach 10 minütiger UDP-Glukose-Dehydrogenasereaktion abgelesen worden waren, errechnet und beziehen sich auf die Standardproben der Konzentrationen 0,25 und 1,0 mM. (Tabelle 1)

Tabelle 1:

Proben	Geschlecht	Alter	Aktivität $\mu\text{mol/h} \times \text{g Hb}$	
			0,25 mM	1,0 mM
1	w	6 M.	18,1	55,7
2	w	3 J. 4 M.	2,6	8,0
3	m	1 J. 1 M.	12,1	37,1
4	w	1 J.	3,5	10,6
5	w	1 J. 1 M.	4,3	13,3
6	m	3 M.	5,2	15,9
7	w	33 J.	3,1	6,5
8	w	8 J.	3,1	6,7
9	m	27 J.	4,7	10,0
10	m	Erw.	6,2	13,2
11	w	Erw.	4,5	9,8

Aus den Aktivitäten mit der Bezugskonzentration 0,25 mM resultieren ein Mittelwert von 6,13 und eine Standardabweichung von $\pm 4,75$, wobei der Bereich Werte zwischen 2,6 und 18,1 $\mu\text{mol/h} \times \text{g Hb}$ umfaßt.

Für die Aktivitäten mit der Bezugskonzentration 1,0 mM ergibt sich ein Mittelwert von 16,98, die Standardabweichung beträgt $\pm 15,4$, während sich der Bereich von 6,5 bis 55,7 $\mu\text{mol/h} \times \text{g Hb}$ erstreckt.

Abbildung 2 zeigt je 2 Eichkurven für beide Standardkonzentrationen. Die Abbildungen 3 bis 7 beinhalten am Beispiel der Proben 7 bis 11 die Extinktionsänderung während 10 minütiger UDP-Glukose-Dehydrogenasereaktion bei den Inkubationszeiten 0', 10' und 30'.



Abb. 2: Eichkurven des spektrophotometrischen Tests bei den Standardkonzentrationen 0,25 und 1,0 mM.

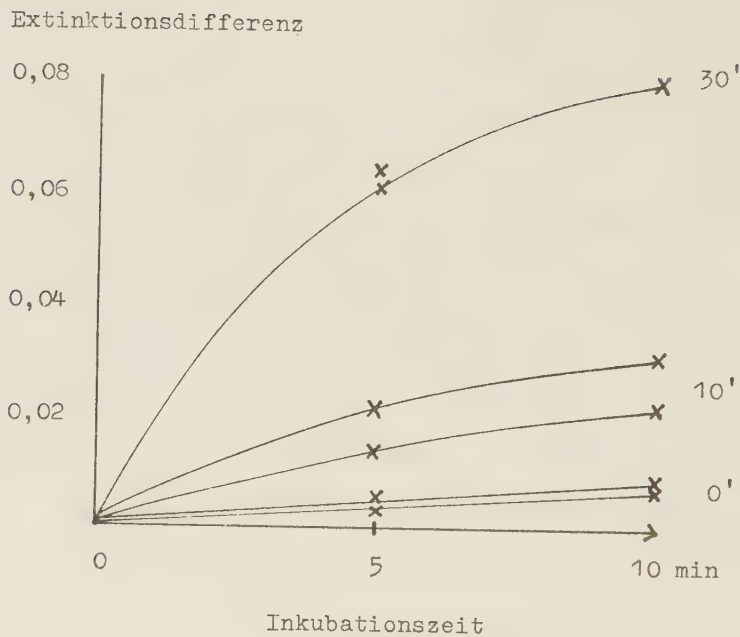


Abb. 3: Spektrophotometrischer Test
in Erythrozyten
Probe 7 (33 J., w.)
der Tabelle 1

Extinktionsdifferenz

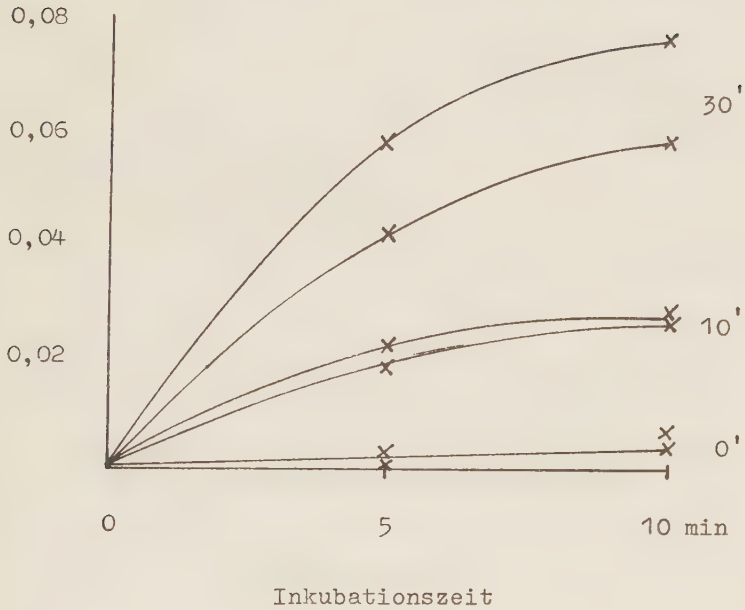


Abb. 4: Spektrophotometrischer Test
 in Erythrozyten
 Probe 8 (8 J., w.)
 der Tabelle 1

Extinktionsdifferenz

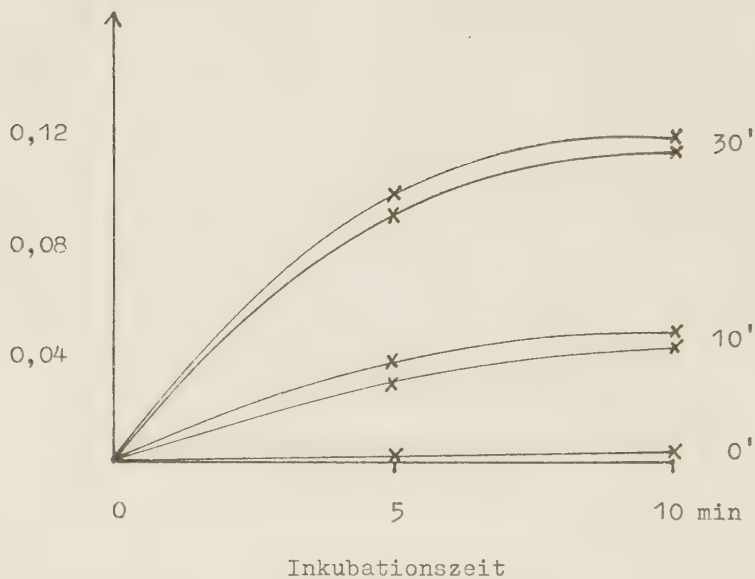


Abb. 5: Spektrophotometrischer Test
in Erythrozyten
Probe 9 (27 J., m.)
der Tabelle 1

Extinktionsdifferenz

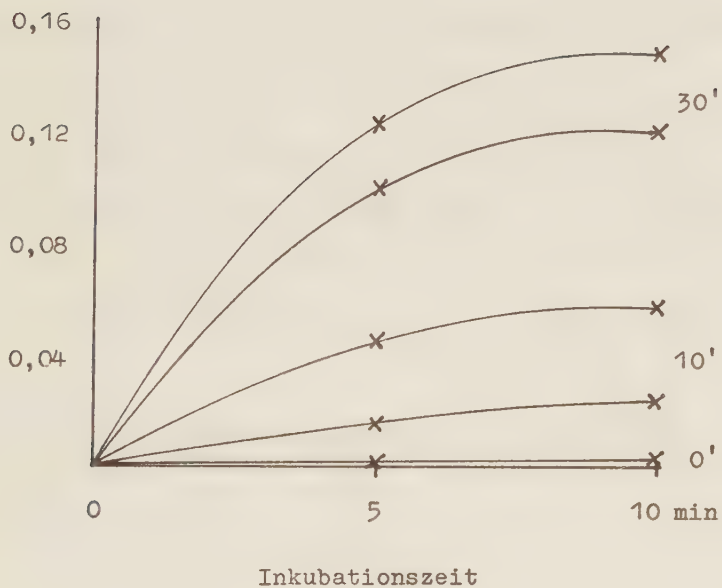


Abb. 6: Spektrophotometrischer Test
 in Erythrozyten
 Probe 10 (Erw., m.)
 der Tabelle 1

Extinktionsdifferenz

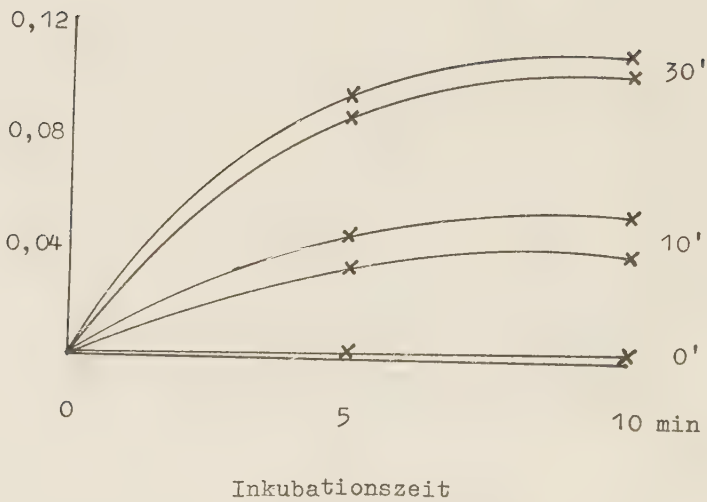


Abb. 7: Spektrophotometrischer Test
in Erythrozyten
Probe 11 (Erw., w.)
der Tabelle 1

4.2 Messung der Epimeraseaktivität in Erythrozyten
nach der Isotopenmethode

Bei den 35 Kontrollpersonen im Alter zwischen 10 Tagen und 42 Jahren wurde die Aktivität des Enzyms UDP-Galaktose-4-Epimerase in Erythrozyten bestimmt (Tabelle 2). Es errechnen sich ein Mittelwert von 22,57 und eine Standardabweichung von $\pm 6,58$ bei einem Normbereich zwischen 12 und 40 $\mu\text{mol/h} \times \text{g Hb}$. Es läßt sich keine Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Alter der Probanden nachweisen (Abb. 8). Besonders groß ist die Streubreite im ersten Lebensjahr.

Tabelle 2:

<u>Probe</u>	<u>Geschlecht</u>	<u>Alter</u>	<u>Aktivität ($\mu\text{mol/h} \times \text{g Hb}$)</u>
1	w	6 Mon.	18
2	m	15 Jhr.	20
3	m	30 Jhr.	19
4	w	5 Mon.	25
5	m	2 Mon.	30
6	m	1 Mon.	21
7	m	15 Tg.	20
8	m	10 Tg.	29
9	m	18 Mon.	18
10	m	9 Mon.	16
11	m	1 Mon.	20
12	w	2 Mon.	32
13	m	2 Mon.	20

Probe	Geschlecht	Alter	Aktivität ($\mu\text{mol/h} \times \text{g Hb}$)
14	m	4 Mon.	35
15	w	42 Jhr.	13
16	w	18 Mon.	14
17	m	6 Mon.	32
18	w	10 Mon.	24
19	w	11 Jhr.	16
20	m	13 Jhr.	18
21	m	33 Jhr.	21
22	w	2 Mon.	21
23	w	42 Jhr.	17
24	m	2 Mon.	40
25	m	5 Mon.	20
26	w	27 Jhr.	27
27	m	8 Mon.	12
28	w	25 Jhr.	18
29	m	1 Jhr.	31
30	w	17 Jhr.	21
31	m	29 Jhr.	32
32	w	6 Mon.	25
33	m	7 Mon.	20
34	w	22 Jhr.	21
35	m	13 Jhr.	24

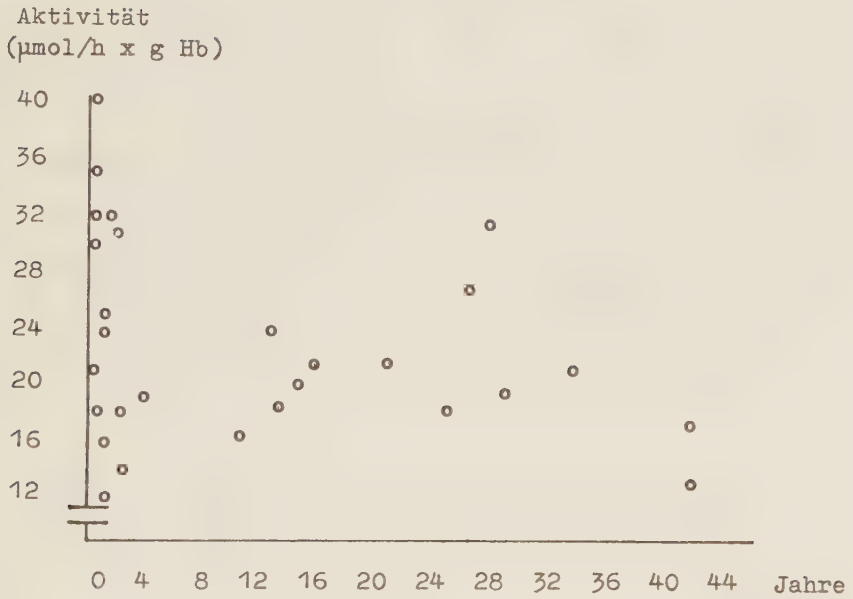


Abb. 8: Altersabhängigkeit der Epimerase

4.3 Kinetikbestimmung der Epimerase in Erythrozyten nach der Isotopenmethode

Bei 9 Kontrollpersonen im Alter zwischen 2 Monaten und 35 Jahren (Tabelle 3) wurde die Kinetik der Epimerase in Erythrozyten gemessen, indem verschiedene UDP-Galaktose-Konzentrationen im 1. Schritt des Testes angewandt wurden, nämlich 5 mM, 3 mM, 2 mM und 1 mM. Die Michaelis-Konstante K_M bezeichnet diejenige Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit die Hälfte ihres Maximalwertes erreicht. Der Mittelwert beträgt 1,08, die Standardabweichung $\pm 0,39$, während der Normbereich Werte zwischen 0,60 und 1,67 mM/l aufweist. Durch doppelt reziproke Auftragung der Geschwindigkeit v und der Substratkonzentration S erhält man eine Darstellung der Kinetik nach Lineweaver-Burk.

Die Abbildungen 9 bis 11 zeigen die Kinetik am Beispiel der Blutproben 1 bis 3, Abbildung 1 zeigt die Eichgerade.

Tabelle 3:

Probe	Geschlecht	Alter	K_M -Wert
1	w	35 Jhr.	1,67
2	w	2 Mon.	0,67
3	m	18 Jhr.	0,72
4	m	2 Mon.	0,60
5	m	4 Mon.	1,43
6	w	30 Jhr.	1,11
7	m	1 Jhr.	1,21
8	m	7 Mon.	1,48
9	m	13 Jhr.	0,83

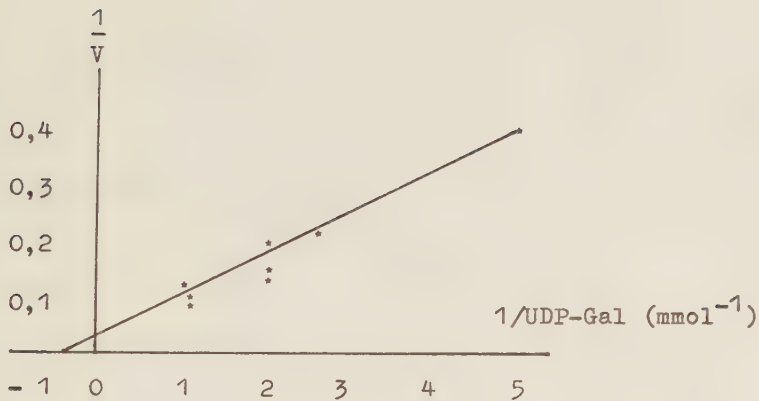


Abb. 9: Lineweaver-Burk-Diagramm in Erythrozyten
nach der Isotopenmethode

Probe 1 der Tabelle 3 (35 Jhr., w.)

K_M für UDP-Gal = 1,67 mM

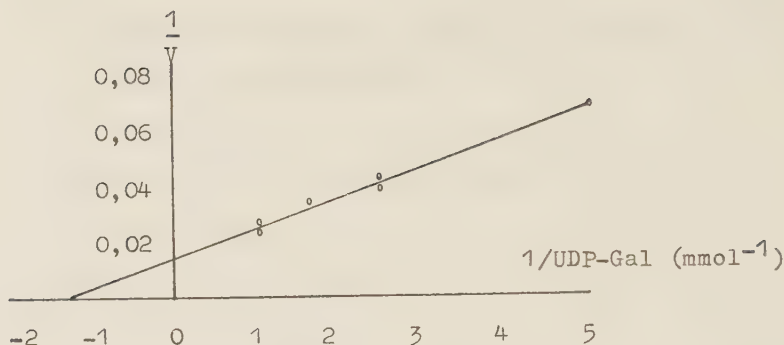


Abb. 10: Lineweaver-Burk-Diagramm in Erythrozyten
nach der Isotopenmethode
Probe 2 der Tabelle 3 (2 Mon., w.)
 K_M für UDP-Gal = 0,67 mM

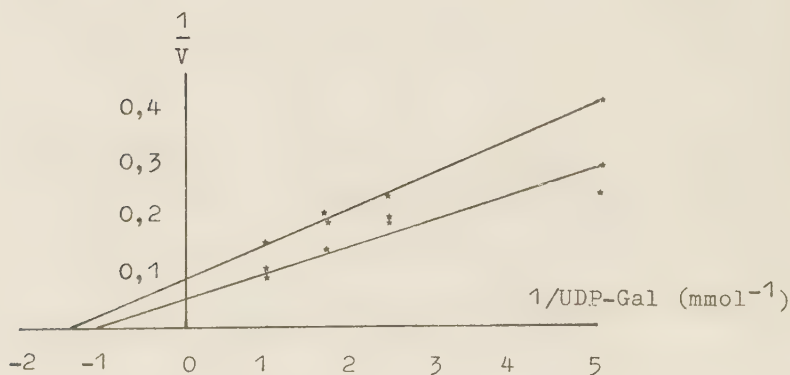


Abb. 11: Lineweaver-Burk-Diagramm in Erythrozyten
nach der Isotopenmethode
Probe 3 der Tabelle 3 (18 Jhr., m)
 K_M für UDP-Gal = 0,72 mM

4.4 Enzymaktivität in den Erythrozyten eines Patienten

Bei einem 9 Monate alten Jungen wurde ein homozygot vererbter Defekt der Epimerase diagnostiziert, bei der Mutter konnte Heterozygotie festgestellt werden, während vom Vater kein Untersuchungsmaterial vorlag. In Tabelle 4 sind die kinetischen Daten des Patienten und seiner Mutter aufgeführt und werden in Abbildung 12 in einem Diagramm dargestellt.

Tabelle 4:

Probe und UDP-Gal-Konz.		Aktivität $\mu\text{mol/h} \times \text{g Hb}$	K_M -Wert
Patient	5 mM	5,95 / 5,22	ca. 10,0
"	3 mM	2,70 / 3,58	
"	2 mM	2,22	
"	1 mM	0,17	
Mutter	5 mM	9,10 / 8,94	3,33
"	2 mM	5,20 / 4,90	
"	1 mM	3,20	

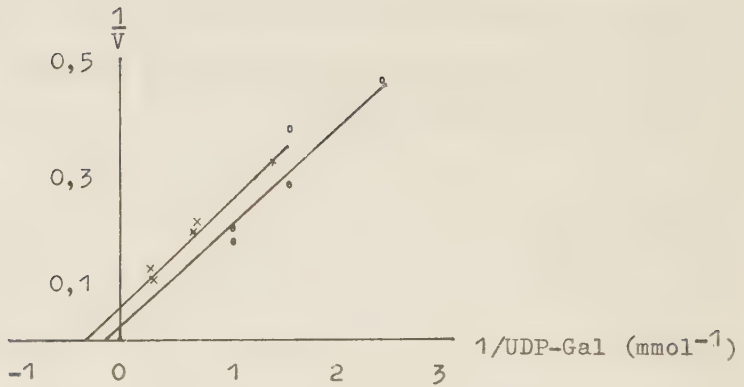


Abb. 12: Lineweaver-Burk-Diagramm in Erythrozyten eines Patienten und seiner Mutter nach der Isotopenmethode

Patient (9 Mon., m.) : $\circ$ — K_M für UDP-Gal = 10 mM

Mutter : $\times$ — K_M für UDP-Gal = 3,3 mM

(siehe Tabelle 4)

4.5 Die Epimerase in Leber- und Nierengewebe

Die Aktivitäten der Epimerase in Leber- und Nierengewebe (Tabelle 5) sind mit jenen in Erythrozyten vergleichbar, sie schwanken in einem Bereich zwischen 2,85 und 48 nmol/min x mg Protein.

Abbildung 13 zeigt die Kinetik am Beispiel der Leberproben 4 und 5 und der Nierenprobe 3.

Tabelle 5:

Probe	Geschlecht	Aktivität $\frac{\text{nmol}}{\text{min} \times \text{mg Protein}}$	K_M - Wert
-------	------------	--	--------------

Leberprobe

1	m	7,84 / 4,89	2,00
2	m	2,85	1,25
3	w	3,00	1,67
4	m	9,33	0,35
5 (fetal)		3,18	0,59
6	m	6 / 7 / 7	1,43
7	m	4 / 4 / 4	1,43
8	w	48/32/47/31	----

Nierenprobe

1	m	6,40 / 4,80	1,50
2	m	2,70 / 3,80/2,90	0,90
3	m	6,50	0,42
4	w	3,50 / 3,30	1,43
5	w	43,00	0,60

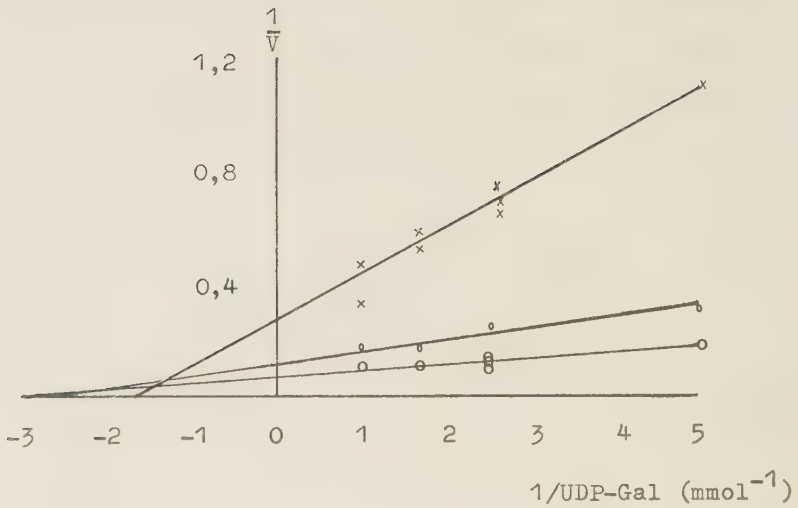


Abbildung 13:

Lineweaver-Burk-Diagramm in Leber und Niere nach der Isotopenmethode

Leberprobe 4 (Erw., m.): -o- K_M für UDP-Gal = 0,35

Leberprobe 5 (fetal, m.): -x- K_M für UDP-Gal = 0,59

Nierenprobe 3 (Erw., m.): -•- K_M für UDP-Gal = 0,42

5. DISKUSSION

5.1 Zur Methodik

Ein Vergleich zwischen der spektrophotometrischen und der Isotopenmethode verdeutlicht die Vorteilhaftigkeit der letzteren, die vor allem in der höheren Empfindlichkeit und Einfachheit begründet ist. Obwohl die Isotopenmethode weniger Substrat (20 μ l Überstand der 1. Reaktion) und Hilfsenzym (2 μ l Pyrophosphorylase) benötigt als die photometrische Methode (50 μ l Überstand der 1. Reaktion, 20 μ l UDP-Glu-Dehydrogenase), erhält man weitaus verlässlichere Ergebnisse, wie ein Vergleich der verschiedenen Eichkurven zeigt (Abbildung 1 und 2). Die Eichkurven des photometrischen Testes differieren in ihren Duplikaten der UDP-Galaktose-Konzentrationen 0,25 und 1,0 mM erheblich, während die Duplikate für die Eichwerte des Isotopentestes nur gering voneinander abweichen und eine eindeutige Gerade bilden.

Ebensolche Unterschiede sind aus den Reaktionsabläufen der Proben 8 (Abb. 4) und 10 (Abb. 6) ersichtlich, und zwar Extinktionsdifferenzen zwischen 0,02 und 0,03. Als Ursache hierfür kommen starke Schwankungen der Anzeige am Photometer während der UDP-Glu-Dehydrogenase-reaktion in Frage, während bei der Isotopenmethode diskontinuierlich die Radioaktivität gemessen wird. Da mit der Isotopenmethode auch niedrige spezifische Aktivitäten genauer erfaßt werden, ist sie zur Ermittlung von pathologischen Blut- und Gewebeproben und Rohextrakten (siehe Tab. 5), die oft wenig Enzymaktivität enthalten, besser geeignet.

Die technische Ausführung des Isotopentestes ermöglicht die Messung von 10 - 20 Proben in einem einzigen Ansatz, wogegen die spektrophotometrische Messung einer größeren Anzahl von Proben sich umständlicher gestaltet (10). Ein entscheidender Nachteil der spektrophotometrischen Methode resultiert aus der NADH-Messung, da Stoffe wie Hämoglobin, die um 340 nm absorbieren, die Aktivitätsmessung stören. Insbesondere hemmt NADH nach unseren Untersuchungen die Epimerase (11).

5.2 Die Aktivität der Epimerase in Erythrozyten

Der Normbereich für das Enzym UDP-Galaktose-4-Epimerase in Erythrozyten umfaßt Werte zwischen 12 und 40 μmol Substratumsatz / h x g Hb mit einer durchschnittlichen Aktivität von 23 μmol / h x g Hb. Bei dem Patienten mit homozygotem Epimerasedefekt wurde ein Wert zwischen 5 und 6 μmol / h x g Hb gefunden, bei seiner Mutter um 9 μmol / h x g Hb.

Ebenso wiesen Gitzelmann und Steinmann in den Erythrozyten der Eltern ihres Patienten intermediäre Enzymaktivität nach, wobei allerdings die Werte des Patienten sich gegen Null bewegten (5). In einer Kontrollgruppe von 32 Personen erstreckte sich der Normbereich der Epimeraseaktivität in Erythrozyten von 2,72 bis 7,91 μmol / h x ml bei einem Mittelwert von 4,9 und einer Standardabweichung von $\pm 1,17$. Es bestand keine Korrelation der Epimeraseaktivität zum Alter der Probanden und man fand auch keinen Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Untergruppen.

Oyanagi et al. (7) berichteten von einem Patienten, der in den Erythrozyten eine Epimeraseaktivität von 7,5 % des Normalwertes aufwies und zwar $0,96 \mu\text{mol} / \text{h} \times \text{ml}$ bei einem Mittelwert der erwachsenen Kontrollpersonen von 10,73 und einer Standardabweichung von $\pm 1,52$. Die Tatsache, daß in der Leber des Patienten normale Epimerasespiegel gemessen wurden, könnte durch die Existenz eines instabilen Apoenzyms erklärt werden.

Garibaldi et al. (9) stellten bei ihrem Patienten mit generalisiertem Epimerasedefekt eine sehr niedrige Aktivität in den Erythrozyten fest ($0,29 \mu\text{mol} / \text{h} \times \text{ml}$), bei den Eltern nur wenig höhere ($0,65$ bzw. $0,72 \mu\text{mol} / \text{h} \times \text{ml}$); als Vergleichswert von 17 normalen Kontrollpersonen gaben sie $3,87 \pm 0,51$ an, womit ihr Normbereich viel niedriger angesiedelt ist als jener, der von Oyanagi ermittelt wurde, und so eher mit dem von Gitzelmann und Steinmann angegebenen Bereich korreliert.

Wie in den Abbildungen 3 bis 7 dargestellt ist, resultierte im spektrophotometrischen Test bei der Inkubationsdauer von $0'$ im Gegensatz zu $10'$ und $30'$ immer eine Gerade. Da trotz fehlender Inkubation und damit ohne Epimerasereaktion dennoch eine geringe Extinktion zustande kam, muß auf anderen Stoffwechselwegen eine gewisse Menge NADH_2 gebildet worden sein. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß bei Neugeborenen höhere NADH_2 - Spiegel gefunden wurden, die im spektrophotometrischen Epimerasetest erhöhte $0'$ - Kurven bzw. generell erhöhte Epimeraseaktivitäten verursachen könnten, was die Spezifität des spektrophotometrischen Testes zur Diagnose eines Epimerasedefektes verringert.

Die Kurven, welche die Inkubationszeiten 10' und 30' bezeichnen, verlaufen höchstens bis zur 4. Minute annähernd linear, um dann in linkskonvexer Krümmung bis zur 10' - Marke zusehends zu verflachen.

Aktivitätsmessungen der Transferase und Epimerase in Erythrozyten erbrachten vergleichbare Ergebnisse (12), ebenso wie die beiden Enzyme in gezüchteten Fibroblasten und Amnionzellen ähnliche Werte aufweisen (13).

5.3 Die Aktivität der Epimerase in Leber und Niere

Die Aktivitätsmessungen der Epimerase in Leber- und Nierengewebe (Tabelle 5) ergaben ähnliche Werte wie die Messungen der Galaktose-1-phosphat-Uridyltransferase; die K_M - Werte schwanken in einem etwas weiteren Bereich, nämlich zwischen 0,35 und 2,0. Diese Schwankung in der Aktivität und den K_M - Werten könnte von der Instabilität der Epimerase im Vergleich zu der relativen Stabilität der Uridyltransferase verursacht werden (11), da die Gewebe zu unterschiedlichen Zeiten nach dem Tode entnommen wurden. In der Literatur finden sich keine Normalwerte für die Epimeraseaktivität in menschlicher Leber und Niere.

Gitzelmann und Steinmann (5) konnten ebenso wie Oyanagi et al. (7) in ihrem erstmals beschriebenen Fall von Epimerasedefekt keine erniedrigte Aktivität in der Leber entdecken.

Von Holton et al. (3) liegen bezüglich der Leber keine Untersuchungsergebnisse vor, wohl aber berichten sie von

erniedrigter Epimeraseaktivität in Erythrozyten (0,1 μ mol / h x ml bei einem Mittelwert von 4,63, einer Standardabweichung von $\pm$ 1.08 und einem Bereich von 3,0 bis 6,2) und Fibroblasten ihres Patienten, während Gitzelmann und Steinmann bei den in vitro gezüchteten Hautfibroblasten keinen Epimerasemangel nachweisen konnten. Es wäre sehr interessant, eine Studie der Isoenzyme der Epimerase durchzuführen, um unterschiedliche klinische Expressionen des Epimerasemangels zu erklären.

Garibaldi et al. (9) schilderten das Krankheitsbild eines generalisierten Epimerasedefektes, wobei Erythrozyten, Fibroblasten und Lymphozyten beteiligt waren. Die Autoren waren der nicht von uns geteilten Meinung, daß eine Leberbiopsie zum Nachweis eines generalisierten Epimerasedefektes überflüssig sei, wenn verminderte Aktivitäten in den Kulturzellen nachgewiesen worden seien.

6. Z U S A M M E N F A S S U N G

In der vorliegenden Arbeit wird über die Ergebnisse der methodischen Untersuchung der Epimeraseaktivität am Beispiel verschiedener Gewebe berichtet. Beim Vergleich der Methodik zur Bestimmung der Epimeraseaktivität konnte festgestellt werden, daß die Isotopenmethode durch höhere Genauigkeit der herkömmlichen spektrophotometrischen Messung überlegen ist.

Daher scheint diese Methode geeignet zu sein, bei allen Patienten, welche die Symptome der klassischen Galaktosämie zeigen, auch einen Mangel der Epimerase durch Testung der Erythrozyten auszuschließen.

Für Erythrozyten wurde ein Normbereich der Epimeraseaktivität zwischen 12 und 40 $\mu\text{mol} / \text{h} \times \text{g Hb}$ gefunden, in Leber- und Nierengewebe wurden Aktivitäten zwischen 3 und 48 $\text{nmol} / \text{min} \times \text{mg Protein}$ gemessen.

Die Kinetik in den untersuchten Geweben ist nahezu identisch, die Messungen ergaben K_M - Werte für UDP-Gal zwischen 0,35 und 2,0 mM.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- (1) Stryer, L.: Biochemie, S. 266 - 267 (1975).
Viehweg & Sohn, Braunschweig / Wiesbaden.
- (2) Karlson, P., Gerok, W., Groß, W.: Pathobiochemie,
S. 30 (1978). Thieme Verlag Stuttgart.
- (3) Holton, J.B., Gillett, M.G., Mac Faul, R.,
Young, R.: Galactosaemia: a new severe variant due
to uridine diphosphate galactose-4-epimerase defi-
ciency. Arch. Dis. Childh. 56, 885 - 887 (1981).
- (4) Gitzelmann, R.: Deficiency of uridine diphosphate
galactose 4-epimerase in blood cells of an appa-
rently healthy infant. Preliminary communication.
Helv. Paediatr. Acta 27, 125 - 130 (1972).
- (5) Gitzelmann, R., Steinmann, B.: Uridine diphosphate
galactose 4-epimerase deficiency. II. Clinical
follow up, biochemical studies and family investi-
gation. Helv. Paediatr. Acta 28, 497 - 510 (1973).
- (6) Gitzelmann, R., Steinmann, B., Mitchell, B., Haigis,
E.: Uridine diphosphate galactose 4-epimerase defi-
ciency. Report of eight cases in three families.
Helv. Paediatr. Acta 31, 441 - 452 (1976).

- (7) Oyanagi, K., Nakata, F., Hirano, S., Sogawa, H., Takayanagi, N., Minami, R., Tsugawa, S., Nakao, T., Ichihara, N.: Uridine diphosphate galactose 4-epimerase deficiency. Eur. J. Paediatr. **135**, 303 - 304 (1981).
- (8) Benn, P.A., Shows, T.B., Croce, C.M., Orkiszewski, Mellman, W.J.: Assignment of a gene for uridine diphosphate galactose 4-epimerase to human chromosome 1 by somatic cell hybridization, with evidence for a regional assignment to pter $\rightarrow$ 1 p21. Cytogenet Cell Genet **24**, 138 - 142 (1979).
- (9) Garibaldi, L.R., M.D., Canini, S., M.S., Superti-Furga, A., Lamedica, G., M.D., Filocamo, M., M.S., Marchese, N., M.S., Borrone, C., M.D.: Galactosemia caused by generalized uridine diphosphate galactose 4-epimerase deficiency. J. Pediatr. **103**, 927 - 930 (1983).
- (10) Shin, Y.S., von Rücker, A., Rieth, M., Endres, W.: Assay of UDP-Galactose-4-Epimerase. Clin. Chem., **28**, 2332 - 2333 (1982).
- (11) Shin, Y.S., Eign, C., Endres, W.: Variability in clinical expression of UDP-galactose-epimerase-deficiency. Manuskript in Vorbereitung.

- (12) Shin-Bühring, Y.S., Osang, M., Tan, T., Beier, A., Schaub, J.: The activity of galactose-1-phosphate uridyltransferase and galactokinase in human fetal organs. *Pediatr. Res.* **11**, 1043 - 1051 (1977).
- (13) Shin-Bühring, Y.S., Leitner, H., Henseleit, H., Wirtz, A., Haas, B., Schaub, J.: Characteristics of galactokinase and galactose-1-phosphate uridyltransferase in cultivated fibroblasts and amniotic fluid cells. *Hum. Genet.* **48**, 31 - 37 (1979).

LEBENS LAUF

Name: Eign Christian
Geburtsdatum: 11. Juli 1959
Eltern: Eign Manfred und Erika, geb. Englberger
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schul Ausbildung:

Grundschule: 1965 - 1970 in Straubing
Gymnasium: 1970 - 1979 in Metten St. Michael
Abitur im Juni 1979

Grundwehrdienst: Juli 1979 - September 1979 in
Roth b. Nürnberg und Klingholz

Medizinstudium:

Beginn: im Wintersemester 1979/80
an der Universität in Regensburg
Ärztl. Vorprüfung: August 1981
Fortsetzung des Studiums an der Ludwig-
Maximilians-Universität in München

Ärztliche Prüfung:

I. Abschnitt: August 1982
II. Abschnitt: August 1984
III. Abschnitt:
schriftl. Teil: Oktober 1985
mündl. Teil: November 1985
Erteilung der Approbation im Dezember 1985

Wehrpflicht: April 1986 - März 1987
Sanitätsakademie in München und
Kreiswehrrersatzamt in Regensburg



